

微生物药物筛选

文章编号: 1001-8689(2018)01-0022-06

以FK506结合蛋白52为靶点的高通量药物筛选模型的建立及应用

栗若兰¹ 赵峰¹ 徐岩¹ 王欣荣² 郑海州¹ 苟小军² 路新华¹ 张雪霞¹ 褚以文^{2*} 郑智慧^{1,*}

(1 华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 微生物药物国家工程研究中心, 河北省工业微生物代谢工程技术研究中心, 石家庄市新药筛选技术工程实验室, 石家庄 050015; 2 抗生素研究与再评价四川省重点实验室, 四川抗菌素工业研究所, 成都大学, 成都 610052)

摘要: **目的** 发现新的FKBP52抑制剂类药物, 建立以人FKBP52为靶点的高通量药物筛选模型。**方法** 通过大肠埃希菌表达系统重组表达FKBP52蛋白, 并进行纯化。基于FKBP52的肽基-脯氨酰顺反异构酶(peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase, PPIase)的活性特性, 建立FKBP52高通量药物筛选体系。对本公司化合物库中的31558个放线菌及真菌次级代谢产物粗提物进行筛选。**结果** 成功构建重组表达菌株BL21(rosetta)/pET-30a/FKBP52。纯化后的重组表达人FKBP52蛋白纯度大于90%, 并具有很好的PPIase活性。阳性药FK506能剂量依赖地抑制FKBP52活性, IC_{50} 为12.035ng/mL。筛选得到121个抑制率大于80%的样品, 其中11株放线菌的次级代谢产物中含FK506, 6株放线菌的次级代谢产物中含FK520, 7株放线菌的次级代谢产物中含雷帕霉素。对随机抽取的100块96孔板筛选数据进行统计, 模型的信号/本底比平均值为 2.35 ± 0.26 , Z因子平均值为 0.78 ± 0.1 。**结论** 本研究成功建立了人FKBP52抑制剂高通量药物筛选模型, 该方法具有快捷、灵敏度高、稳定性好的特点, 不仅可以快速进行新FKBP52抑制剂的筛选, 还可以实现对FKBP52已知抑制剂如FK506、FK520和雷帕霉素等产生菌的定向筛选。

关键词: FK506结合蛋白52; FK506; FK520; 雷帕霉素; 高通量筛选; 抑制剂

中图分类号: R979.5, Q819 **文献标志码:** A

Development and application of a high-throughput screening assay for inhibitors of human FK506 binding protein 52

Li Ruo-lan¹, Zhao Feng¹, Xu Yan¹, Wang Xin-rong², Zheng Hai-zhou¹, Gou Xiao-jun², Lu Xin-hua¹, Zhang Xue-xia¹, Chu Yi-wen² and Zheng Zhi-hui¹

(1 New Drugs Research & Development Limited Liability Company of North China Pharmaceutical Group Corporation, National Engineering Research Center of Microbial Medicine, Hebei Industry Microbial Metabolic Engineering & Technology Research Center, Shijiazhuang Engineering Laboratory for New Drugs Screening, Shijiazhuang 050015; 2 Antibiotics Research and Re-evaluation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu 610052)

Abstract Objective To screen novel FKBP52 inhibitors, and develop a high-throughput screening (HTS) assay. **Methods** The human FKBP52 gene was cloned by RT-PCR from human peripheral blood lymphocyte and recombinantly expressed in *E. coli*. Recombinant human FKBP52 (rhFKBP52) was purified by Ni^{2+} -chelating affinity chromatography column. The screening assay was established using Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA as colorimetric substrate. 31,558 microbial metabolite extracts were screened. **Results** Recombinant expression strain BL21 (rosetta) /pET-30a/FKBP52 was successfully constructed. The purity of rhFKBP52 was over 90% by SDS-PAGE

收稿日期: 2016-11-15

基金项目: 中央引导地方科技创新专项(No. 169676404G); 石发改高技[2011]999号项目

作者简介: 栗若兰, 女, 生于1980年, 硕士, 高级工程师, 研究方向为微生物药物筛选及活性评价, E-mail: liruolan2013@163.com

*通讯作者, 褚以文, E-mail: chuyiwen@mail.sc.cninfo.net; 郑智慧, E-mail: anzhengzhahui@hotmail.com

analysis. And the concentration was 0.862mg/mL. FKBP52 inhibitor FK506 showed an IC_{50} value of 12.035ng/mL. One hundred and twenty-one samples were demonstrated to have high inhibitory activities against FKBP52. Further analysis by HPLC-MS, among these positive samples, eleven actinomycete extracts were proved to contain FK506, six actinomycete extracts contain FK520, and another seven actinomycete extracts contain rapamycin. Based on 100 96-plate screening data, the assay produced the signal/background ratio of 2.35 ± 0.26 , the average of Z' factors was 0.78 ± 0.1 . **Conclusion** This HTS assay for rhFKBP52 inhibitor is robust and sensitive, and this screening assay is not only adaptable for novel rhFKBP52 inhibitors but also for the microbial producing strains of known FKBP52 inhibitors, such as FK506, FK520 and rapamycin.

Key words FK506 Binding Protein 52; FK506; FK520; Rapamycin; High-throughput screening; Inhibitor

FK506结合蛋白(FK506 binding proteins, FKBP5)广泛地存在于原核和真核生物细胞中, 是一类高度同源的受体类结合蛋白。它们都具有肽基-脯氨酰顺反异构酶(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIase)活性, 可以与大环内酯类免疫抑制剂FK506、FK520以及雷帕霉素(rapamycin)等结合而抑制PPIase的活性, 从而产生免疫抑制和神经保护等多种生理功能^[1]。

FK506结合蛋白52(FK506 binding protein52, FKBP52)是FKBPs家族的一个成员, 主要定位于细胞核内, 在胞质内也有一定表达。FKBP52由3个功能结构区组成^[2], 分别为FK1区(PPIase活性区)、FK2区(类PPIase活性区)以及TPR区(肽重复序列)。其中FK1区包含一个FK506结合位点, 具有PPIase活性。FKBP52的主要功能之一是对中枢神经微管稳定性的调节, FKBP52与神经元微管蛋白结合, 导致微管的稳定性下降甚至降解。FK506、雷帕霉素等与FKBP52的FK1区结合后能够抑制FKBP52 PPIase的活性, 从而产生神经保护、神经营养及促进神经元生长的功能^[3]。近年来研究发现, FKBP52与多种癌症的发生发展关系密切。FKBP52在乳腺癌^[4]和前列腺癌^[5]等癌症中的表达显著升高, 参与了肝癌^[6]细胞的增殖、分化过程。FKBP52的FK1区与甾体受体的配体结合区以及微管上的动力蛋白结合, 将结合了配体的受体输入细胞核, 完成后续的转录过程, 促进前列腺癌的发生发展。FKBP52为神经中枢系统的神经退行性疾病以及多种癌症等相关疾病的治疗方法上提供了新的思路, 成为了重要的新药物研发靶点。

本研究旨在建立以FKBP52为靶点的高通量药物筛选模型, 为筛选得到作用于FKBP52靶点的新的先导化合物提供一种快速有效的方法。

1 材料

1.1 质粒和菌种

pGEM-T easy Vector(Promega); 原核表达载体pET-30a(Novagen); 大肠埃希菌DH10B和

BL21(Rosetta)均由本实验室保存。

1.2 主要仪器

PCR仪(Applied Biosystems); 紫外凝胶成像仪(BIO-RAD); 高速低温离心机(Beckman); 细胞超声破碎仪(上海新芝生物技术研究公司); 蛋白纯化系统(Pharmacia); Synergy 2多功能酶标仪(BioTek); 超高效液相分析系统(Waters); 液相色谱-质谱联用(Waters)。

1.3 主要酶和试剂

限制性内切酶*Nde* I、*Xho* I 和DNA marker均为Promega产品; *Ex Taq*, Agarose Gel DNA Purification, DNA Ligation Kit均为TaKaRa公司产品; 显色底物Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA(Sigma); 糜蛋白酶(上海第一生化药业有限公司); 其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 人FKBP52基因的克隆及序列测定

根据NCBI的GenBank数据库中人FKBP52基因的表达序列, 设计引物。上游引物: 5'-GGAATTCCATATGATGACAGCCGAGGAGATGAA-3'(*Nde* I); 下游引物: 5'-CCGCTCGAGTGCTTCTGTCTCCACCTGAGA-3'(*Xho* I)。提取人外周血淋巴细胞总mRNA, 利用RT-PCR方法扩增出人FKBP52基因。PCR产物经Agarose Gel DNA Purification试剂盒胶回收后连接pGEM-T easy Vector, 转入大肠埃希菌DH10B, 挑选阳性克隆测序。

2.2 人FKBP52表达质粒的构建

将测序正确的克隆质粒pGEM-T easy/FKBP52及表达载体pET-30a分别经*Nde* I和*Xho* I双酶切, 纯化后连接, 转化大肠埃希菌DH10B, 挑取单克隆菌落, 进行质粒酶切鉴定, 获得重组质粒pET-30a/FKBP52。将重组质粒转化大肠埃希菌BL21(Rosetta), 构建重组菌株BL21(Rosetta)/pET-30a/FKBP52。

2.3 人FKBP52蛋白表达及纯化

将重组菌株BL21(Rosetta)/pET-30a/FKBP52接种

于含卡那霉素(50 μ g/mL)和氯霉素(34 μ g/mL)的LB培养基中, 37 $^{\circ}$ C培养至 A_{600} 至0.6~0.8, 按1%的接种量转接至含卡那霉素、氯霉素的LB培养基, 经终浓度为1mmol/L的IPTG 20 $^{\circ}$ C低温诱导16h, 收集菌体。裂解缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L NaCl, 20mmol/L咪唑, 5%甘油, 0.1% Triton, pH7.9)超声破碎菌体, 功率600W, 超声3s, 停止8s, 共超声20min。15000r/min, 4 $^{\circ}$ C, 离心20min, 收集上清液, Ni-NTA亲和层析柱纯化蛋白。洗脱缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 50mmol/L NaCl, 5%甘油, 300mmol/L咪唑)洗脱收集样品峰, 制备蛋白样品进行12% SDS-PAGE检测。

2.4 人FKBP52蛋白活性检测^[7]

底物Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA中的Pro残基N端肽键存在顺反式的动态平衡, FKBP52 PPIase能够加速Pro肽键的顺反异构速度, 催化其由顺式向反式构象转变。反应于96孔板中进行, 整个操作过程将96孔板置于冰上, 抑制底物非催化的顺反异构。将底物溶解在LiCl/TFE溶液(470nmol/L)中, 提高底物顺式结构的平衡量, 以利于FKBP52 PPIase催化其由顺式向反式构象的转变。反应缓冲体系含50mmol/L HEPES, 100mmol/L NaCl(pH8.0)。各物质终浓度为FKBP52酶液0.276 μ g/mL, 底物150 μ mol/L, 糜蛋白酶0.6mg/mL。室温不同时间点进行 A_{405} 下的吸光度检测, 每孔设置3个平行。

2.5 FK506及其类似物的定向筛选

样品孔中加入待测样品2 μ L、FKBP52酶工作液20 μ L、糜蛋白酶工作液20 μ L, 对照孔以DMSO代替样品的DMSO溶液, 空白孔以DMSO代替样品的DMSO溶液并以反应缓冲液代替酶液, 使用Synergy 2多功能酶标仪测定各孔在405nm下的 A_1 值。各孔加入底物工作液20 μ L, 室温测定各孔在同样条件下的 A_2 值。反应体系与蛋白活性检测部分相同。对照、空白分别设置4个平行, 样品设置2个平行, 计算样品的抑制率(I)。 $I(\%) = [(\Delta A_{\text{对照}} - \Delta A_{\text{样品}}) / (\Delta A_{\text{对照}} - \Delta A_{\text{空白}})] \times 100\%$, 其中 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

3 结果

3.1 人FKBP52基因的克隆及表达质粒的构建

人FKBP52基因PCR产物琼脂糖凝胶电泳检测的结果与预期片段大小(1377bp)一致(图1)。经测序比对, 该目的条带与GenBank中的人FKBP52基因序列相一致。将重组质粒pET-30a/FKBP52用Nde I和Xho I

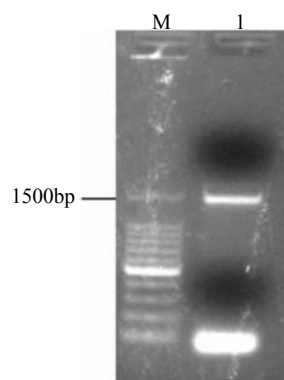
双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定(图2), 得到长度约为1377bp的FKBP52基因目标片段, 结果证明表达质粒pET-30a/FKBP52构建成功。

3.2 重组人FKBP52蛋白表达及纯化

将IPTG诱导的重组菌株BL21(rosetta)/pET-30a/FKBP52超声破碎, Ni-NTA亲和层析柱纯化蛋白, 蛋白样品进行SDS-PAGE电泳分析(图3)。人FKBP52蛋白含459个氨基酸, 分子量约52kDa。IPTG诱导前的全菌蛋白样品中不含52kDa的目标蛋白, 诱导后的全菌蛋白样品中含大量目标蛋白。100~500mmol/L不同浓度咪唑洗脱纯化的蛋白样品中300mmol/L咪唑洗脱纯化的蛋白样品与52kDa目标蛋白大小一致, 纯度达90%以上。经BCA试剂盒检测, 浓度为0.862mg/mL。

3.3 测活体系中人重组FKBP52酶的活性

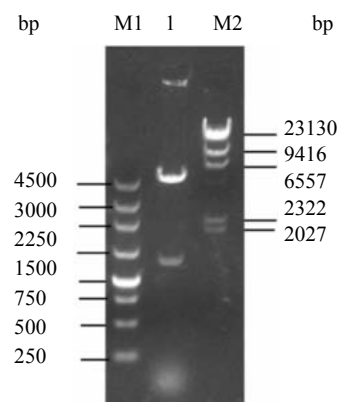
本研究的测定体系是检验人FKBP52的PPIase活性。底物Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA中的Pro残基N



M: 100bp DNA Ladder Marker; 1: FKBP52 PCR产物

图1 FKBP52基因PCR扩增结果

Fig. 1 PCR product of FKBP52 gene



M1: 250bp DNA Ladder Marker; 1: pET-30a/ FKBP52质粒酶切产物 (Nde I, Xho I); M2: λ DNA/Hind III Marker

图2 重组质粒pET-30a/FKBP52的双酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzymatic analysis of vector pET-30a/FKBP52

端肽键存在顺反式的动态平衡，PPIase能够加速Pro肽键的顺反异构速度，催化其由顺式向反式构象转变。通过检测PPIase可以反映FKBP52的活性。如图4所示，与不加酶的空白组相比，加入人FKBP52的PPIase有较强的活性，且其活性随酶浓度增加而升高，表明重组表达的人FKBP52具有生物学活性。

3.4 筛选模型的验证

体系各物质终浓度为FKBP52酶液0.276μg/mL，底物150μmol/L，糜蛋白酶0.6mg/mL。以阳性药FK506验证FKBP52模型的灵敏性。FK506在体系中的起始浓度为150ng/mL，3倍梯度稀释，检验其对FKBP52 PPIase的抑制率。如图5所示，FK506能剂量依赖地抑制人FKBP52 PPIase的活性，其IC₅₀值为12.035ng/mL，对本研究表达的人FKBP52具有较强的抑制作用。

3.5 筛选模型的应用

本研究应用高通量筛选技术，以人FKBP52基因为靶点，对本公司18432个放线菌和13126个真菌的次级代谢产物粗提物进行筛选，得到121个抑制率大于80%的样品。放线菌代谢产物的通过率约为0.412%，真菌代谢产物的通过率为0.343%，结果见表1。通过HPLC-MS方法对阳性样品进行组分分析以及与本公司的化合物数据库信息比较，结果显示11株放线菌的粗提物中含有FK506，6株放线菌的粗提物中含有FK506类似物FK520，7株放线菌的粗提

物中含有雷帕霉素。

3.6 筛选模型的稳定性统计分析

信号/本底比反映的是筛选模型获得的信号平均值与本底平均值之间的差距。从筛选数据中随机选取100块96孔板的筛选数据对信号/本底比进行统计分析(图6)，信号/本底比在2.09~2.57之间，平均值为2.35±0.26。

Z'因子是评价高通量筛选模型的另一个重要指标，它结合了信号的动态变化区间和信号变异这两个与模型质量相关的重要参数，是评价高通量筛选模型的一个重要指标。 $Z' = 1 - 0.03 \times (|S/B| \times CV_{\text{信号}} + CV_{\text{本底}}) / (|S/B| - 1)$ ，其中CV为变异系数。一个稳定的筛选模型Z'因子的范围在0.5~1^[8]。从筛选数据中随机选取100块96孔板的筛选数据进行统计分析，本模型的Z'因子在0.71~0.83(图7)，平均值为0.78±0.1，说明筛选方法稳定性、可靠性好，可用于高通量筛选。

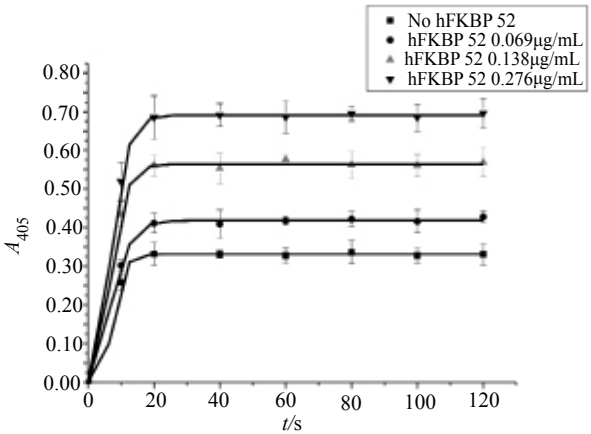


图4 人FKBP52 PPIase活性与反应时间相关曲线
Fig. 4 The relationship between activity of purified human FKBP52 PPIase and reaction time

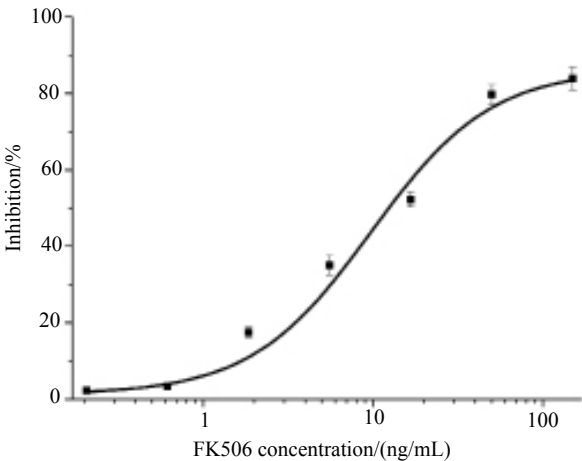
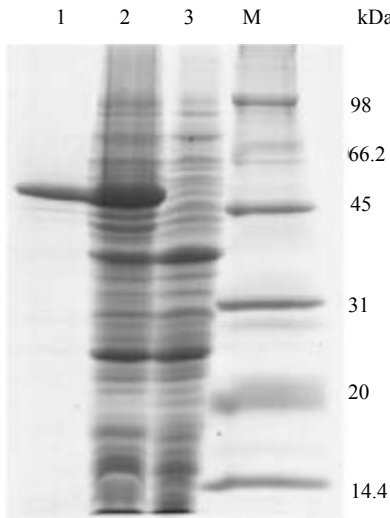


图5 FK506对人FKBP52的抑制活性
Fig. 5 Inhibitory activity of FK506 against hFKBP52



1: 重组人FKBP52纯化蛋白; 2: IPTG诱导后菌株BL21(Rosetta)/pET-30a/FKBP52蛋白; 3: 未经IPTG诱导的菌株BL21(Rosetta)/pET-30a/FKBP52蛋白; M: 蛋白 Marker

图3 重组人FKBP52表达及纯化的SDS-PAGE分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis for expression and purification of recombinant human FKBP52 gene

表1 FKBP52抑制剂筛选结果
Tab. 1 Screening for FKBP52 inhibitors

微生物代谢产物	初筛数量	抑制率大于80% 的样品数量	通过率/%
放线菌代谢产物	18432	76	0.412
真菌代谢产物	13126	45	0.343

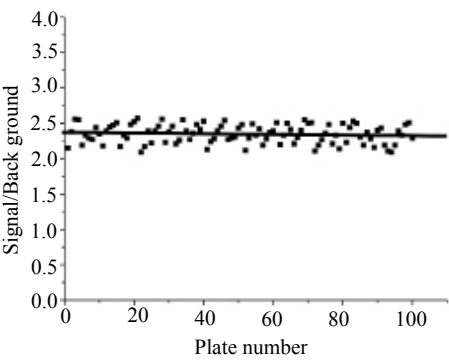


图6 100个96孔板测定数据的信号/本底比值统计
Fig. 6 Signal/ background values of 100 datas of screened plates

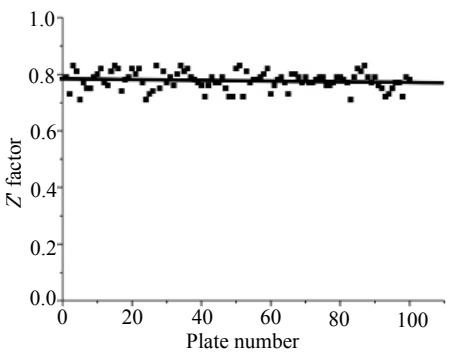


图7 100个96孔板测定数据的Z'因子值统计
Fig. 7 Z' factor of 100 datas of screened plates

4 讨论

随着人们对FKBP52功能及相关疾病研究的不断深入，其临床意义及应用前景也不断地显现，为治疗神经退行性疾病以及癌症等疾病提供了新的思路。为了建立人FKBP52高通量筛选模型，本研究对人FKBP52基因进行了克隆表达，分离纯化人FKBP52蛋白，得到了纯度大于90%的目的蛋白。经过酶活性的测定与评价，建立了以人FKBP52为靶点的高通量筛选模型。阳性药FK506对本研究重组表达的FKBP52有较强的抑制活性，其IC₅₀为12.035ng/mL，表明模型对FK506具有较高的灵敏度。其经筛选验证，模型的信号/本底比在2.09~2.57之间，统计分析Z'因子，其结果在0.71~0.83，表明构

建的模型具有较好的稳定性和灵敏度，可用于高通量筛选。

利用该模型，对本公司保藏的31558个放线菌、真菌来源的粗提物进行筛选，得到了121个具有FKBP52抑制活性的样品。进一步的分析发现，其中放线菌粗提物中11个含有FK506、6个含有FK520和7个含有雷帕霉素，成功筛选出FK506、FK520和雷帕霉素的产生菌。FK506、FK520和雷帕霉素都是大环内酯类的免疫抑制剂，在化学结构上具有很多共同点，属于天然的结构类似物。FK506是一种从链霉菌(*Streptomyces tsukubaensis*)代谢产物中分离得到的大环内酯类免疫抑制剂，FK506通过与FKBPs结合抑制钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)产生免疫抑制活性，具有免疫抑制药效强、用药剂量低、急性排异反应发生率低等优点，在器官移植和自身免疫系统疾病方面疗效显著^[9]。此外，FK506还能够与FKBP52结合而产生神经营养及促受损神经修复的作用^[10-11]。FK520是FK506的类似物，最初作为抗真菌的抗生素被发现。近年来被成功用于抗移植器官排斥，及自身免疫系统相关疾病。雷帕霉素是从放线菌(*Sueptomyces hygroscopicus*)中分离得到的天然化合物，通过与FKBPs结合，通过抑制mTOR的活性起到免疫抑制剂作用。另外，雷帕霉素衍生物通过抑制mTOR抑制肿瘤细胞的生长和增殖，在肿瘤治疗方面的作用突出，已被应用于临床^[12-13]。

FKBP52作为营养神经、癌症等靶点，其小分子配体(如FK506)已被认为是潜在的神经退行性疾病、前列腺癌的治疗药物。处于临床研究的FKBP52抑制剂主要有CNS therapeutics和ILS-920，均为雷帕霉素衍生物^[14]。CNS therapeutics作为治疗神经损伤和神经退行性疾病，如亨廷顿症、帕金森症的药物，具有神经营养的作用，而没有免疫抑制的活性，已完成临床前试验。ILS-920用于中风的治疗，已完成I期临床试验。筛选FKBP52抑制剂并进行深入探究，是寻找治疗神经退行性疾病、癌症等疾病药物及免疫抑制剂的有效途径。

本研究结果表明，建立的筛选模型灵敏、稳定，该筛选方法不仅可以快速进行新的神经退行性疾病、抗前列腺癌药物的筛选，也可以用于FK506、雷帕霉素、FK520产生菌及其衍生物的药物筛选和活性评价。FKBP52及其抑制剂的深入研究具有广阔的发展前景，值得进一步深入探讨。

参考文献

- [1] 刘菲, 魏继福, 孟玲, 等. 大环内酯类免疫抑制剂的研究进展[J]. 药学与临床研究, 2014, 22(1): 61-66.
- [2] Yanik G, Levine J E, Ratanatharathorn V, *et al.* Tacrolimus (FK506) and methotrexate as prophylaxis for acute graft-versus-host disease in pediatric allogeneic stem cell transplantation[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2000, 26(2): 161-167.
- [3] Chambraud B, Sardin E, Giustiniani J, *et al.* A role for FKBP52 in Tau protein function[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(6): 2658-2663.
- [4] Sivits J C, Storer C L, Galigniana M D, *et al.* Regulation of steroid hormone receptor function by the 52kDa FK506 binding protein(FKBP52)[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2011, 11(4): 314-319.
- [5] De Leon J T, Iwai A, Feau C, *et al.* Targeting the regulation of androgen receptor signaling by the heat shock protein 90 cochaperone FKBP52 in prostate cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(29): 11878-11883.
- [6] 李传伟, 王雪迪, 张智, 等. FKBP12和FKBP52在肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. 中国癌症防治杂志, 2014, 6(2): 138-142.
- [7] Kofron J L, Kuzmic P, Kishore V, *et al.* Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl *cis-trans* isomerases by an improved spectrophotometric assay[J]. *Biochemistry*, 1991, 30(25): 6127-6134.
- [8] Zhang J H, Chung T D, Oldenburg K R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays[J]. *J Biomol Screen*, 1999, 4(2): 67-73.
- [9] Liu J, Farmer J D, Lane W S, *et al.* Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes[J]. *Cell*, 1991, 66(4): 807-815.
- [10] Sharkey J, Butcher S P. Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischaemia[J]. *Nature*, 1994, 371(6495): 336-339.
- [11] Lyons W E, George E B, Dawson T M, *et al.* Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(8): 3191-3195.
- [12] Weischer M, Rocken M, Berneburg M. Calcineurin inhibitors and rapamycin: Cancer protection or promotion[J]. *Exp Dermatol*, 2007, 16(5): 385-393.
- [13] Zoncu R, Efeyan A, Sabatini D M. mTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(1): 21-35.
- [14] SciMore数据库[DB/OL]. <http://www.pharmaprojects.com/terms.htm>.